

LAZARTE, MARTIN ATILIO

Efecto de la cada rolacion de eC3 en vacuna por cada una mesa en liter.

75078

2016

75078



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA
MAESTRÍA EN PRODUCCIÓN EQUINA

EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE eCG EN YEGUAS PREÑADAS CON SEMEN DE BURRO

TESIS

TESISTA

Martín Atilio Lazarte, MV

*Capitán Veterinario
Jefe de Sección - Haras General Las Heras
Establecimiento Campo Los Andes - Mendoza
Dirección de Remonta y Veterinaria - Ejército Argentino*

DIRECTOR

Dra. Carolina Bianchi

*Área de Endocrinología - Facultad de Ciencias Veterinarias,
Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires - Argentina*

Río Cuarto – Argentina

Marzo de 2016



CREAR. CREAR. CREAR.

JURADO DE TESIS

Ana Elisa Alonso; MV, PhD

Ayudante de Primera, Cátedra de Teriogenología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

José Javier Aguilar Valenciano; MV, MSc, PhD

Profesor Adjunto Efectivo de Producción Equina, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Argentina

Marcelo Horacio Miragaya; MV, MSc, PhD

Profesor Titular, Cátedra de Teriogenología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires, Argentina

Clasif:
T- 1023

75078

Agradecimientos

Quiero expresar mi agradecimiento más profundo y sentido para mi familia. Sin su apoyo, colaboración e inspiración habría sido imposible finalizar mi tesis.

A mi esposa Alejandra por su ejemplo de superación y tenacidad y a mis hijas María Lujan y María Delfina.

Un especial reconocimiento a la Dra Carolina Bianchi, como directora de esta tesis, me ha orientado y corregido en mi labor científica con interés y abnegación.

Un agradecimiento muy especial al personal de Oficiales, Suboficiales, Soldados y Agentes Civiles del Establecimiento Campo Los Andes-Haras General Las Heras, por su apoyo, trabajo y colaboración.

Índice

I.INTRODUCCIÓN	9
Progesterona durante la gestación de la yegua.	9
Cuerpo Lúteo	9
Tipos de células luteales.....	9
Progesterona	10
Estrógenos.....	11
Gonadotropina Coriónica Equina.....	12
Origen de la eCG en la Yegua	12
Función de la eCG.....	13
Gestaciones de Híbridos Equinos	14
Suplementación con eCG.....	15
II.HIPÓTESIS.....	17
III.OBJETIVOS.....	18
IV.MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
V.DISEÑO EXPERIMENTAL Y TRATAMIENTO	20
Muerte Embrionaria y Abortos	20
Suplementación con eCG.....	20
Determinación de Progesterona en suero	21
Determinación de Sulfato de estrona en suero	21
Análisis estadístico	21
VI.RESULTADOS	22
Progesterona	24
Cuerpos Lúteos Suplementarios	26
Estrógeno Conjugado- Sulfato de Estrona	29
Muerte Embrionaria y Abortos	30
Discusión	30
VII.CONCLUSIÓN	33
VIII. REFERENCIAS.....	34

Índice de tablas

Tabla 1: Resumen de resultados a los 35 días de gestación	23
Tabla 2: Resumen de resultados a los 40 días de gestación	23
Tabla 3: Resumen de resultados a los 50 días gestación	23
Tabla 4: Resumen de resultados a los 60 días gestación	23
Tabla 5: Resumen de resultados a los 70 días gestación	24
Tabla 7: Resumen de Perdidas Embrionaria y Abortos –Haras Gral. Las Heras –Temporada 2011-2015	30
Tabla 8: Resumen de Perdidas Embrionarias y Abortos –Gpo eCG y Gpo Control.....	30

Índice de figuras

Figura 1: Concentración sérica de progesterona (ng/ml) de Ñequiza (aborto a los 60 días de gestación) y de los grupos eCG y control desde los 35 hasta los 60 días de gestación.	22
Figura 2: Concentraciones séricas de progesterona (ng/ml). Grupo eCG vs Grupo Control desde los 50 hasta los 80 días de gestación (* $p < 0,065$).....	25
Figura 3: Concentraciones séricas individuales de Progesterona en yeguas del Grupo eCG.	25
Figura 4: Concentraciones séricas individuales de Progesterona en yeguas del Grupo Control.	26
Figura 5: Concentraciones séricas de progesterona (ng/ml) desde los días 50 hasta los 80 de gestación agrupados por número de cuerpos lúteos en Grupo eCG y Grupo Control.	27
Figura 6: Concentraciones de Sulfato de Estrona (ng/ml) desde los 35 hasta los 80 días de Gestación. Grupo eCG y Grupo Control.	29
Imagen Nro. 1 Ovario Izquierdo –Yegua Igualdad a los 60 días de Gestación (Gpo eCG) Margen derecho el Cuerpo Lúteo Primario de la Ovulación – Margen Izquierdo Cuerpo Lúteo suplementario.....	27
Imagen Nro. 2 Ovario Izquierdo –Yegua Ñata a los 60 días de Gestación (Gpo eCG). Centro de la imagen Cuerpo Lúteo Primario de la Ovulación – Margen Izquierdo Cuerpo Luteo suplementario. Esta yegua tuvo los niveles más altos de P4 en el Gpo eCG (Fig 3), también desarrollo otro Cuerpo Lúteo suplementario en el Ovario Derecho	28
Imagen Nro. 3 Ovario Derecho –Yegua Hiedra a los 60 días de Gestación (Gpo Control) Margen izquierdo inferior el Cuerpo Lúteo Primario de la Ovulación – Margen izquierdo superior Cuerpo Lúteo suplementario. Esta yegua tuvo los niveles más altos de P4 en el Gpo Control Fig 4, no desarrollo otro Cuerpo Lúteo suplementario en el Ovario Derecho hasta la última ecografía del estudio el día 80 de gestación.	28

Efecto de la administración de eCG en yeguas preñadas con semen de burro

RESUMEN

Durante la gestación de la yegua preñada por un padrillo, las cúpulas endometriales secretan gonadotropina coriónica equina (eCG) desde los 35 - 40 hasta los 120 -150 días. En contraste, en las yeguas preñadas con semen de burro las cúpulas endometriales no se desarrollan al ser rechazadas por la acción de los leucocitos maternos a partir de las 7^{ma} y 11^{ava} semanas con descenso de las concentraciones plasmáticas de eCG hasta niveles no detectables. La incidencia de abortos reportados luego de los 40 días de gestación en las yeguas preñadas con semen de burro puede llegar hasta el 30%, significativamente más alta que los abortos en las yeguas preñadas de padrillo (5%). El objetivo de este estudio fue determinar la tasa de pérdida embrionaria y abortos en yeguas preñadas con semen de burro y evaluar el efecto del tratamiento con eCG sobre la formación de cuerpos lúteos secundarios, las concentraciones plasmáticas de progesterona, de sulfato de estrona y pérdidas embrionarias y abortos.

Para determinar la tasa de pérdida embrionaria/abortos se utilizaron 574 yeguas preñadas durante las temporadas 2011-2015 registrando pérdidas embrionarias, abortos y nacimientos de mulas. Para el estudio experimental relacionado con el efecto de la eCG exógena se emplearon 10 yeguas preñadas de burro, las cuales a los 35 días fueron asignadas al azar en dos grupos: uno que recibió eCG exógena (n=5) y otro que permaneció como control no tratado (n=5). El grupo eCG recibió dosis crecientes totales y luego de mantenimiento de eCG (día 35 = 400 UI, día 37 = 600 UI, día 40 = 1200 UI, día 45 = 1600 UI y los días 50, 55, 60, 65, 70, 75 y 80 = 1600 UI) por vía intramuscular. Se realizaron ecografías transrectales los días 35, 40, 50, 60, 70 y 80 de gestación determinando el número de cuerpos lúteos suplementarios. Se recolectaron muestras de sangre los mismos días de la ecografía por venopunción. El suero obtenido fue almacenado en freezer (-20°C) hasta realizar las determinaciones de progesterona y sulfato de estrona.

En este estudio, la tasa general de pérdidas embrionarias y abortos fue del 15% (89/574 yeguas preñadas con semen de burro). La formación de cuerpos lúteos suplementarios acumulados hasta el día 80 de gestación fue significativamente más alto en las yeguas del grupo eCG (n° de CL = 2,60±0,5), que en las yeguas del grupo Control (n° de CL = 1,43±0,5) (p <0,005). En relación a las concentraciones séricas de progesterona, no hubo efectos significativos del tratamiento p=0,2987, efecto del tiempo (días) p=0,9067, y no fue detectado interacción entre el tratamiento y los días p=0,8975. Sin embargo, se constataron, en este ensayo, diferencias significativas (p<0,002), a partir del día 50 de gestación hasta el día 80, en las concentraciones séricas de progesterona en el Grupo eCG con 3 cuerpos lúteos. No se detectaron diferencias (p>0,05) en la concentración de Sulfato de Estrona entre los Grupos eCG y Control entre los 35 a 60 días de gestación. La concentración de Sulfato de Estrona fue mayor en el Grupo eCG (p<0,05) durante los 70-80 días de gestación. En conclusión: la suplementación con eCG exógena desde los 35 hasta los 80 días de gestación podría estimular la formación de nuevos cuerpos lúteos suplementarios y causar una respuesta variable en las concentraciones de progesterona y sulfato de estrona en yeguas preñadas con semen de burro.

Effect of exogenous eCG administration in mares pregnant by donkey

ABSTRACT

During the normal pregnancy of mares impregnated by horse, endometrial cups secrete equine chorionic gonadotropin (eCG) from day 35 to 40 to 120 to 150 day of gestation. In contrast, mares impregnated by donkey (mule pregnancies) the endometrial cups derived from chorionic cells of the mule embryo are promptly rejected and eCG concentrations do not increase or increase slightly from day 40 to 60, decreasing to undetectable concentrations between the 7th and 11th week of gestation. The incidence of abortions after 40 days of gestation reported in pregnant mares with semen from donkey can reach up to 30%, significantly higher than the abortions in pregnant mare's stallion (5%). The aim of this study was to determine the embryonic loss rate and abortions in pregnant mares with semen from donkey and evaluate the effect of injection of eCG on secondary corpora lutea formation, on serum concentrations of progesterone, of estrone sulfate and embryonic losses and abortions. Pregnant mares (n=574) were used during the 2011-2015 seasons recording embryonic loss, abortions and births of mules. For the experimental study, ten mares pregnant by donkey were randomly assigned to one of two groups in the 35 day of gestation (n=5 per group). The eCG group received increasing doses of exogenous eCG (day 35 = 400 UI, day 37 = 600 UI, day 40 = 1200 UI, day 45 = 1600 UI and days 50, 55, 60, 65, 70, 75 y 80 = 1600 UI) by intramuscular injection. Five mares served as control group and did not receive exogenous eCG treatment. Both groups were examined by ultrasound on days 35, 40, 50, 60, 70 and 80 of gestation to determine the number and type of corpora lutea. Blood samples were obtained the same days of ultrasound examinations to determine serum concentrations of progesterone and estrone sulfate. In this study, abortion and embryonic loss rate was 15% (89/574 pregnant mares with semen from donkey). The formation of additional corpora lutea accumulated until day 80 of gestation was significantly higher in eCG group (number CL = 2.60 ± 0.5) than in control group (1.43 ± 0.5) ($p < 0.005$). In relation to serum concentrations of progesterone, there were no significant treatment effects $p = 0.2987$, effect of time (days) $p = 0.9067$, and was not detected interaction between treatment and days $p = 0.8975$. However, there were significant differences in serum progesterone concentrations from day 50 to day 80 of gestation in the eCG group with 3 corpora lutea. There were no differences ($p > 0.05$) in the concentration of estrone sulfate between eCG and control groups between 35-60 days of gestation. The estrone sulfate concentration was higher in the eCG group ($p < 0.05$) during the 70-80 days of gestation.

In conclusion, the supplementation with exogenous eCG stimulates the formation of new corpora lutea and causes an additional variable response in the serum concentrations of progesterone and estrone sulfate.

I. INTRODUCCIÓN

La endocrinología de la gestación de la yegua es un buen ejemplo de los mecanismos complejos y biológicos involucrados en el mantenimiento de la preñez en esta especie.

Existen varios fenómenos endocrinológicos involucrados en el primer tercio de gestación de la yegua, como es el origen y secreción de progesterona, estrógenos, gonadotropina coriónica equina (eCG) y la interacción de esta con las hormonas Folículo Estimulante (FSH) y Luteinizante (LH) durante la gestación temprana.

Progesterona durante la gestación de la yegua.

Cuerpo Lúteo

Es una glándula endocrina temporaria en el ovario adulto formado a partir de la luteinización de la pared folicular luego de la ovulación del folículo dominante al final del estro (Niswender y Nett, 1994). Este evento implica una proliferación y diferenciación de las células del folículo ovulatorio (células de la teca y granulosa) en células luteales esteroideogénicas como así también un rápido desarrollo de vasos sanguíneos (angiogénesis) y de vasos linfáticos (linfogénesis) (Murphy, 2004). El proceso de luteinización está asociado al incremento de la expresión de la actividad de la enzima citocromo P450 responsable de convertir el colesterol en pregnenolona en la mitocondria (Ronen-Fuhrmann et al., 1998) y el mecanismo de ingreso del colesterol a la mitocondria de las células luteales es una importante área de investigación aunque podría actuar una proteína identificada y caracterizada como STAR (Steroideogenic Acute Regulatory Protein), ya que se observó que mutaciones en el gen que codifica esta proteína en humanos provoca la disminución de la síntesis de hormonas esteroideas en estos individuos (Ho et al., 2004).

Tipos de células luteales

Las células luteales de las especies domésticas son clasificadas en dos tipos de acuerdo a su tamaño y densidad. Las células luteales grandes (>20 μ de largo y 30 μ de **diámetro**) en rumiantes (vacas y ovejas) sintetizan y secretan más progesterona que las células luteales chicas (<20 μ de largo y 17 μ de **diámetro**). Las células luteales grandes derivan de las células de la granulosa y las células luteales chicas derivan de las células de la teca (Sherwood y Fields, 1999). La alta síntesis y secreción de progesterona en las células luteales grandes está asociado a la mayor expresión de enzimas como la P450 en las mitocondrias como así también las células luteales grandes po-

drían contener más retículo endoplásmico, mitocondrias y aparato de Golgi (Stouffer y Brannian, 1993).

Estudios en otras especies domésticas indican que el número y tipo de células que conforman el cuerpo lúteo pueden cambiar durante la vida del mismo. En ovinos, en el cuerpo lúteo existen marcadas diferencias entre las células chicas y grandes referido a la respuesta y número de receptores para factores luteotróficos o luteogénicos, las células luteales grandes ovinas tienen una mínima respuesta a factores luteotróficos como LH, mientras que las células luteales chicas tienen una gran respuesta incrementando los niveles de síntesis y secreción de progesterona ante el estímulo de LH (Stouffer, 2006).

En la yegua se denomina cuerpo lúteo primario a la estructura formada luego de la ovulación durante el estro (Ghinter, 1992), por otra parte, recibe el nombre de cuerpo lúteo secundario, la glándula lúteal formada luego de la ovulación de folículos maduros durante el diestro o en la gestación temprana y también puede ocurrir la luteinización de folículos anovulatorios en presencia de eCG durante los primeros 90 días de gestación y recibe el nombre de cuerpo lúteo accesorio. La suma de cuerpos lúteos accesorios y secundarios se denominan cuerpos lúteos suplementarios (Ghinter, 1992). La función principal de los cuerpos lúteos primarios, secundarios y accesorios es la síntesis y secreción de progesterona, hormona que tiene numerosas acciones sobre los tejidos pero particularmente en el tracto reproductivo durante la gestación temprana, manteniendo el medio ambiente uterino apropiado para la supervivencia del concepto equino (Niswender y Nett, 1994).

Progesterona

Es una hormona esteroidea que deriva del colesterol y el sitio primario de síntesis y secreción son las células del cuerpo lúteo y la placenta en las yeguas preñadas (Allen, 2000). La síntesis de progesterona por parte de las células esteroideogénicas comienza en las mitocondrias, donde el colesterol se convierte en pregnenolona por el complejo enzimático P450 y la pregnenolona luego transportada al retículo endoplásmico donde la enzima 3β -hidroesteroidea deshidrogenasa la convierte en progesterona y es difundida al sistema circulatorio por la célula (Niswender et al., 2000). El mecanismo de acción de la progesterona parece ser a través de la unión a sus receptores nucleares y la vía de regulación de la expresión génica (síntesis de proteínas), lo cual conlleva a sus acciones que son modular efectos locales como la síntesis y secreción de proteínas en el lumen uterino, y sistémicos como la regulación de la actividad de síntesis y secreción de las gonadotropinas a través de sus acciones a nivel del hipotálamo (regulación de GnRH) y de la adenohipófisis (regulación de LH y FSH) (Bishop y Stormshak, 2008).

En el ciclo reproductivo de la yegua no preñada, el cuerpo lúteo es el principal sitio de síntesis y secreción de progesterona durante las dos semanas del diestro. Luego, el cuerpo lúteo regresa al final del diestro por la acción de la Prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) secretada por el endometrio. En la yegua preñada los eventos iniciales en la formación del cuerpo lúteo y la secreción inicial de progesterona son iguales que en la yegua en diestro, aunque la presencia del concepto equino en el lumen uterino inhibe la secreción de $PGF_{2\alpha}$ y, consecuentemente, la luteólisis, resultando en el mantenimiento del cuerpo lúteo y, por ende, en la continuidad de la secreción de progesterona por el cuerpo lúteo primario. El mismo secreta altas concentraciones de progesterona entre los días 3-8 de gestación, los niveles declinan entre los días 10-30 debido a la disminución en las concentraciones plasmáticas de los factores luteotróficos (LH). Entre los días 38 - 40 de gestación los niveles de progesterona se incrementan nuevamente por la acción de la Gonadotropina Coriónica equina (eCG) la cual es sintetizada y secretada por las cúpulas endometriales. La misma es una hormona luteotrófica y luteogénica que estimula la formación de cuerpos lúteos suplementarios, los cuales generan picos de concentraciones plasmáticas de progesterona de aproximadamente 15 ng/ml a los 60 días. Luego estos niveles comienzan a declinar a los 118 días en respuesta a la disminución de la secreción de eCG, en relación a la regresión de las cúpulas endometriales y a los 180 días los niveles séricos de progesterona son de 1- 2 ng/ml (Wilsher y Allen, 2011).

Estrógenos

Los estrógenos son hormonas esteroideas derivadas del colesterol y son producidos primariamente por los ovarios. En la síntesis y secreción están involucradas células de la teca y de la granulosa (Christensen 2011). El colesterol en los folículos ingresa a las células de la teca y es almacenado en las vacuolas citoplasmáticas, por acción de la LH que regula el funcionamiento del complejo enzimático proteico esteroideogénico (StAR) y luego es transportado hacia la mitocondria donde se transforma en pregnenolona y en androstenediona, esta última es transportada hacia las células de la granulosa y, por acción de la FSH, convertida en estrógenos (principalmente 17β -estradiol) por acción de una aromatasa (Stocco y Clark, 1996).

En la yegua preñada durante la gestación temprana el cuerpo lúteo sintetiza y secreta cantidades significativas de estrógenos (principalmente conjugados como sulfato de estrona) (Daels et al., 1998). El patrón de biosíntesis del estrógeno en el cuerpo lúteo no es completamente conocido, pero es sabido que los estrógenos sintetizados en la gestación temprana pueden ser de dos tipos: estrógenos no conjugados (17β -estradiol o estrona) o conjugados en forma de sulfatos (sulfato de estrona). Los niveles de concentraciones plasmáticas y urinarias de estrógenos no conjugados (17β -estradiol) es

limitado y de poca utilidad clínica no así las concentraciones plasmáticas y urinarias de sulfato de estrona, las cuales son de aplicación e interpretación clínica (Daels et al., 1991).

En equinos, se ha observado que existe una relación temporal entre los incrementos de la secreción de estrógenos a los 40 días de gestación y el comienzo de la secreción de la eCG por las cúpulas endometriales. Ginther ha propuesto la hipótesis de que la secreción de estrógenos podría estar estimulada por la eCG (Ginther, 1979). Daels (1998) luego reporta que la eCG estimularía la síntesis de estrógenos y andrógenos en el cuerpo lúteo de la yegua preñada a partir de los 35 días de gestación y específicamente la eCG estimularía el complejo enzimático 3β hidroxil-esteroide deshidrogenasa, citocromo P450, 17α hidroxilasa, 17-20 liasa y la enzima aromatasasa en el cuerpo lúteo en diestro y en la gestación temprana (Albrecht et al, 2001).

Gonadotropina Coriónica Equina

En 1930, Harold Cole y George Hard descubrieron la existencia de la gonadotropina sérica de la yegua preñada (PMSG), también llamada Gonadotropina Coriónica equina (eCG), enunciando y demostrando el patrón general de secreción de la eCG (Murphy, 2012). Dicha hormona aparece en el suero alrededor de los días 37 a 41 luego de la ovulación alcanzando el pico entre los días 60 y 90, desapareciendo completamente entre los días 120-160 (Mestre et al.,2011).

La eCG es una glicoproteína de 72.000 KD, con una composición alta de carbohidratos (45%) compuesta por ácido siálico, galactosa y glucosamina (Sugino et al., 1987). Su estructura es similar a las Gonadotropinas pituitarias (FSH y LH) las cuales también son hormonas glicoproteicas que consisten en dos cadenas: una α y una β . La subunidad α indica la especificidad de especie y es común a todas las hormonas glicoproteicas de origen hipofisario o coriónico mientras que la subunidad β es la diferente indicando la especificidad de la actividad biológica de cada hormona (Murphy, 2012). Una de las propiedades más interesante de la hormona eCG es la habilidad para expresar acción biológica como FSH y LH cuando es administrada a otra especie mamífera diferente al equino y en contraste con la hCG que expresa acción de LH tanto en el humano así como cuando es administrada a otras especies(Mestre et al.,2011).

Origen de la eCG en la Yegua

Schauder en 1912, mencionó la existencia de una serie de protuberancias sobre el cuerpo grávido en el primer tercio de gestación, las cuales no tenían aparentemente relación

con el desarrollo de las membranas fetales (Allen, 1984). Luego Cole y Gass en 1943, concluyeron que estas protuberancias eran las cúpulas endometriales y que son el lugar de síntesis de eCG. Desde aquí, esta hormona ingresa en el torrente sanguíneo materno por un complejo y largo sistema de lagunas linfáticas las cuales se desarrollan en el tejido endometrial (Allen, 1984).

Allen y Moor en 1972 disecaron la faja de tejido coriónico de un embrión equino de 34 días de gestación y luego cultivaron *in vitro* el tejido disecado, produciendo colonias de largas células binucleadas epiteloideas que secretaban altas concentraciones de eCG en un medio de cultivo por 180 días. El cultivo de las células mostró características morfológicas similares a las células de las cúpulas endometriales *in vivo* (Mestre et al., 2011). La banda coriónica fue por primera vez descrita por Cossar Ewart en 1897 constituyendo una compleja banda cercana al ecuador del saco embrionario, luego fue descrito con más detalle por Allen en 1973. La banda coriónica comprende células trofoblásticas en desarrollo alrededor de la circunferencia del concepto equino esférico. Aparecen histológicamente alrededor del día 25 post ovulación como una capa de células trofoblásticas dispuestas como crestas formando pliegues pocos profundos. El día 32 de gestación, las células trofoblásticas proliferan rápidamente principalmente formando largas proyecciones de células elongadas, las cuales comienzan a mantenerse aplanadas superficialmente en aposición con el endometrio, formando un estratificado de células trofoblásticas de 8-10 células profundas como una estructura glandular. Estas glándulas secretan un mucus exocrino que parece ayudar a unir la superficie del tejido de la faja coriónica con el endometrio. En el día 32, células uninucleadas trofoblásticas de la banda coriónica comienzan a diferenciarse en células binucleadas no invasivas capaz de sintetizar eCG. En los días 36 y 38 las células hiperplásicas binucleadas (trofoblásticas) de la superficie de la banda coriónica invaden vigorosamente y destruyen la lámina epitelial del endometrio y continúan migrando debajo de las glándulas endometriales y del estroma endometrial, 24 a 48 horas después las células trofoblásticas dejan de migrar y comienzan a compactarse en forma redondeada y alargadas en el endometrio formando las típicas cúpulas endometriales (Van Niekerk y Allen, 1975). El mecanismo de control del proceso de proliferación, diferenciación y consecuentemente migración de la banda coriónica de trofoblastos continua siendo desconocido (Enders et al., 1995).

Función de la eCG

La secuencia de aminoácidos de las dos subunidades son idénticas a las subunidades de la LH (Bousfield et al., 1996), ambas hormonas se unen al mismo receptor a veces referido como receptor de LH/eCG (Saint-Dizier et al., 2004) y la afinidad por el receptor de eCG es menor con respecto a la LH, esa diferencia está producida por la glicosilación de ambas hormonas.

En yeguas preñadas con semen de padrillo el incremento de las concentraciones plasmáticas de eCG se produce entre los días 40 a 120 de gestación asociado con la estimulación luteal de la secreción de progesterona y estrógenos (Daels et al., 1998; Allen, 2001; Boeta y Zarco, 2005;). Aparentemente la presencia de eCG durante la preñez tiene un importante efecto luteogénico, estimulando la formación de cuerpos lúteos suplementarios y actúa después del día 35 de gestación estimulando la ovulación o la luteinización de folículos dominantes a diferentes tiempos (Allen, 2001). También existe un efecto estimulador de la eCG sobre el cuerpo lúteo primario de la gestación el cual usualmente comienza a incrementar la secreción de progesterona después del inicio de la secreción de eCG entre los días 35 y 38 de gestación (Allen, 1984; Boeta y Zarco, 2005). El cuerpo lúteo primario expresa receptores a LH/eCG desde los días 14 hasta 100 días de gestación (Saint-Dizier et al., 2003) y la administración exógena de eCG tiene tendencia a incrementar los niveles de producción de progesterona y estrógeno en la gestación temprana de la yegua (Daels et al., 1998). Por otra parte, el efecto luteotrófico puede ser muy importante estimulando los cuerpos lúteos accesorios formados después del día 35. La desaparición de la eCG ocurre después del día 120 conjuntamente con la regresión de las cúpulas endometriales y por consiguiente, el cuerpo lúteo primario y suplementarios (Bergfelt et al., 1989). La redundancia de efectos de eCG y LH y la simultánea presencia de ambas hormonas en la gestación de la yegua preñada con semen de padrillo hace difícil evaluar la dependencia de aspectos específicos de la fisiología ovárica y la relación con la secreción de eCG (Boeta y Sarco, 2005).

Gestaciones de Híbridos Equinos

Los primeros reportes que describieron la influencia del genotipo fetal paterno en la secreción de eCG en yeguas y burras gestando mulas (madre yegua-padre burro) y burdéganos (madre burra y padre padrillo) fueron de Allen en 1969. En burras gestando burdéganos, la banda coriónica es más ancha comparada con la gestación de un burro, y existe un gran desarrollo de las cúpulas endometriales con altos niveles de eCG con concentraciones promedios entre 180-250 UI/ml y con formación de numerosos cuerpo lúteos suplementarios (Allen, 1982). En yeguas gestando mulas, el desarrollo de las cúpulas endometriales es limitado y reducido con poca formación de tejido endometrial, comparado con la gestación de potrillos, y se caracteriza por bajas concentraciones de eCG circulante, 5-40 UI/ml, alrededor del día 50 de gestación. Se postula que los leucocitos maternos reaccionan con el antígeno paterno (burro) e invaden las cúpulas endometriales causando la prematura destrucción del tejido endometrial entre los 60 y 70 días de gestación, desapareciendo precozmente la eCG del plasma de la yegua (Allen, 1982). Por consiguiente, las concentraciones plasmáticas de eCG son significativamente más bajas en gestaciones de yeguas preñadas con semen de burro en comparación



con yeguas preñadas con semen de padrillo, observación que también fue reportada por Boeta y Zarco (2005).

La presencia de eCG protege al cuerpo lúteo primario de los efectos luteolíticos de la prostaglandina $F_{2\alpha}$. (Flores et al., 2014) A menor concentración de eCG en yeguas preñadas con feto de mula, existe una mayor susceptibilidad de sufrir una regresión luteal por $PGF_{2\alpha}$, secreción inducida por un agente traumático, evento infeccioso, cólico o endotoxemia (Boeta y Zarco, 2005).

El número de cuerpos lúteos suplementarios acumulados durante la gestación es significativamente más alto en yeguas preñadas con semen de padrillo que en yeguas preñadas con semen de burro, sugiriendo que altos niveles de eCG en yeguas preñadas tienen un efecto luteogénico induciendo la formación de cuerpos lúteos suplementarios. La mayoría de los abortos en yeguas preñadas con semen de burro están asociados con diferentes tipos de mal funcionamiento luteal (Boeta y Zarco, 2010). Se ha reportado que la diferencia en tasas de muerte embrionaria no fue significativa en gestaciones de mulas y caballos antes del día 40 de gestación (Boeta y Zarco, 2010). Bajas concentraciones de eCG (deficiencia luteal secundaria) es la causa más importante de abortos en yeguas preñadas con semen de burro pero esta disfunción luteal también fue reportado como causa de abortos en yeguas preñadas con padrillos (Boeta y Zarco, 2010).

La incidencia de abortos de yeguas preñadas con semen de burro puede llegar hasta el 30 % en los primeros 150 días de gestación según datos reportados por Boeta y Zarco (2005).

Suplementación con eCG

La administración exógena de eCG fue inicialmente utilizada para la inducción de ovulaciones múltiples en vacas y ovejas (debido a la acción FSH que posee en estas especies (Betteridge, 1977). Sin embargo, la inducción de ovulaciones múltiples en yeguas utilizando la inyección exógena de eCG no produjo resultados satisfactorios (Day, 1939). Dinger en 1972 administró en forma endovenosa e intramuscular inyecciones de eCG (1000-5000 UI) en yeguas tratadas con progesterona sin resultados significativos relacionados con efectos sobre actividad ovárica (Shore, 1989). Allen en 1984, administró varias inyecciones de altas dosis de eCG (20.000–300.000 UI) vía endovenosa en yeguas gestando un embrión de burro, entre los días 35 y 80 de gestación, dos de las ocho yeguas tratadas exhibieron ovulaciones y formación de cuerpos lúteos secundarios, luego de 3 inyecciones de eCG acompañado de incrementos significativos de progesterona plasmáticas. Las 6 yeguas restantes no fueron afectadas por el tratamiento y no exhibieron ovulaciones secundarias. Allen argumentó en su estudio que la eCG

puede inducir la ovulación y formación de cuerpos lúteos secundarios pero debe ser inyectada en el momento que hay suficiente cantidad de folículos maduros capaces de responder a la acción sinérgica de la eCG. En este estudio, Allen sugirió que la eCG por sí misma no es luteotrópica, pero combinada con otros agentes luteotrópicos originados en el feto o en la adenohipófisis actuaría sinérgicamente y estimularía la ovulación y luteinización de folículos formando cuerpos lúteos suplementarios (Shore, 1989). Daels en 1998 reportó que la administración exógena de eCG con dosis progresivas administrada vía intramuscular los días 26 (4 UI/Kg.), 27 (10 UI/Kg.), 28 (16 UI/Kg) a yeguas preñadas con semen de padrillo, provocó una elevación en los niveles de progesterona (18 %) y un incremento significativo de los niveles séricos de estrógeno.

No hemos encontrado reportes previos de suplementación con eCG de gestaciones de embriones de mulas en yeguas gestantes desde el día 35 con dosis crecientes hasta el día 80 de gestación.

II. HIPÓTESIS

- La suplementación con eCG exógena en yeguas preñadas con semen de burro estimula la formación de cuerpos lúteos suplementarios e incrementa las concentraciones plasmáticas de progesterona, de sulfato de estrona y reduce las pérdidas de preñez.

III. OBJETIVOS

- Determinar las tasas de muerte embrionaria y aborto en yeguas preñadas con semen de burro.
- Evaluar el efecto de la eCG exógena en yeguas preñadas con semen de burro administrado a partir de los 35 días de gestación sobre la formación de cuerpos lúteos suplementarios.
- Valorar y correlacionar el número de cuerpos lúteos suplementarios con las concentraciones plasmáticas de progesterona desde los días 35 hasta los días 80 de gestación en yeguas gestando mulas.
- Determinar el efecto de la eCG exógena en yeguas preñadas con semen de burro sobre las concentraciones plasmáticas de estrógenos conjugados.
- Estimar el efecto de la eCG exógena sobre las tasas de pérdida embrionaria y muerte fetal en yeguas preñadas con semen de burro.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Muerte embrionaria y Abortos

En el Haras General Las Heras en Campo Los Andes, Mendoza lugar de producción de mulas del Ejército Argentino se efectuó un estudio retrospectivo utilizando los datos consignados en los libros de Registros de Servicios, Perdida Embrionaria - Abortos y Nacimientos durante las temporadas 2011/2012; 2012/2013; 2013/2014 y 2014/2015

Suplementación con eCG

Sobre un total de 111 yeguas preñadas (Nacimientos 2014- Haras General Las Heras) con semen de burro se utilizaron 10 yeguas mestizas de 400 kg seleccionadas al azar, de entre 6 a 15 años, mantenidas a campo en pasturas consociadas (gramíneas y leguminosa) compuesta por cebadilla, pasto ovillo, trébol, alfalfa y un verdeo de avena durante el invierno. Las yeguas también fueron suplementadas durante el invierno (Julio-Agosto) con granos de avena y alimento balanceado para yeguas preñadas (2 kg avena, 1 kg alimento balanceado/día).

Las yeguas fueron inseminadas y preñadas, con semen fresco de burro de la raza Remonta Argentino utilizando diluyente tipo Kenney a base de leche descremada con una concentración final de semen diluido de 25-50 millones de espermatozoides por ml en un volumen máximo de 25 ml.

La ovulación se indujo en el momento de la inseminación con Gonadotrofina Coriónica Humana (hCG) a una dosis de 2500 UI por vía endovenosa.

Las concentraciones séricas de progesterona, sulfato de estrona y el número de cuerpos lúteos, del Grupo eCG y del Grupo Control, fueron registrados desde los 35 hasta los 80 días de gestación. Se recolectaron muestras de sangre los días 35, 40, 50, 60, 70 y 80. .

V. DISEÑO EXPERIMENTAL Y TRATAMIENTO

Muerte Embrionaria y Abortos

Se utilizaron yeguas preñadas (**n=574**) con semen de burro durante cinco temporadas reproductivas, diagnosticadas por ecografía a los 15 días, nuevamente ecografiadas entre los 60 - 90 días de gestación y a los 270 - 300 días de gestación. Se analizaron los registros de los nacimientos de las mulas.

Suplementación con eCG

Se utilizó un diseño aleatorio. Las yeguas preñadas a los 35 días fueron distribuidas al azar para recibir eCG (Grupo eCG: n = 5) o permanecer como controles no tratados (Grupo Control: n = 5).

La eCG empleada es del Laboratorio Syntex de nombre comercial Novormon 5000 (Frasco ampolla multidosis: conteniendo 5000 UI de eCG liofilizadas), con una concentración de 200 UI por ml

El grupo eCG recibió dosis crecientes totales y luego de mantenimiento de eCG (día 35 = 400 UI, día 37 = 600 UI, día 40 = 1200 UI, día 45 = 1600 UI y los días 50, 55, 60, 65, 70, 75 y 80 = 1600 UI) por vía intramuscular. Se utilizó las dosis más baja del estudio preliminar de Daels 1998, quien administro eCG antes de los 35 días de gestación de potrillos (no hay presente eCG endógena). Desde el primer día del tratamiento hasta el día 45 de preñez, la dosis total acumulada fue de 3800 UI por yegua- La frecuencia de administración y el periodo del estudio desde los 35-80 fue similar al trabajo previo de Allen en 1984.

Se realizaron ecografías transrectales los días 35, 40, 50, 60, 70 y 80 de gestación determinando el número de cuerpos lúteos suplementarios.

Se recolectaron muestras de sangre los mismos días de la ecografía por venopunción utilizando tubos de 10 ml sin anticoagulante. La centrifugación de las muestras se realizó antes de las dos horas de extracción y el suero obtenido fue almacenado en freezer (- 20° C) hasta realizar las determinaciones de las concentraciones séricas de Progesterona y sulfato de estrona.

Determinación de Progesterona en suero

Las concentraciones séricas de progesterona fueron analizadas a través de un kit RIA (Diagnostic Products Corporation, Los Ángeles, CA, USA) previamente validado para su uso con suero equino (Ginther, 2005). La sensibilidad del ensayo fue de 0,1 ng ml⁻¹ y el coeficiente de variación intra-ensayo menor al 8% para concentraciones entre 0,1 y 40 ng ml⁻¹.

Determinación de Sulfato de estrona en suero

Las concentraciones séricas de Sulfato de Estrona fueron analizadas a través de un kit de RIA (Beckman Coulter DSL5400, Immunotech, Praga, República Checa) previamente utilizado con suero equino (Satué et al., 2011). La sensibilidad del ensayo de Sulfato de Estrona fue de 0,01 ng ml⁻¹ y el coeficiente de variación intra-ensayo menor al 5% para concentraciones entre 0,04 y 96 ng ml⁻¹.

Análisis estadístico

Los datos en este estudio fueron examinados por el software InfoStat (Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2014. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>). Los datos fueron cotejados por Prueba de normalidad Shapiro-Wilks modificado. Los datos obtenidos no tienen distribución normal.

Los valores registrados de las variables fueron evaluados por Métodos Estadísticos No Paramétricos, Análisis de la Varianza No Paramétricos -Prueba de Kruskal-Wallis.

Las variables de este estudio son presentados como medidas estadísticas de centro (media, mediana) y como medidas estadística de variabilidad (rango y desviaciones estándar).

En la asociación lineal entre dos variables se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson.

También fue realizado un análisis de variancia contemplado (ANOVA) las mediciones repetidas en el tiempo. Para este análisis fue utilizado el procedimiento PROC MIXED del SAS V9.3 (SAS Institute, Cary, NC, USA).

VI. RESULTADOS

En este estudio todas las yeguas tanto del grupo eCG como del grupo Control tuvieron una sola ovulación en el momento de la Inseminación Artificial con semen fresco de burro. La producción sérica de progesterona hasta el día 35 en ambos grupos (eCG vs Control) fue producida por un solo cuerpo lúteo primario. No hubo muerte embrionaria en ninguno de los grupos hasta el día 60 de gestación.

En el grupo control, una de las yeguas abortó entre los 60 y 70 días de gestación, yegua de nombre Ñequiza. Esta yegua no formó cuerpos lúteos suplementarios y la gestación hasta el día 60 sólo fue mantenida por la secreción de progesterona del cuerpo lúteo primario. Las concentraciones séricas de progesterona de esta yegua no fueron estadísticamente diferentes ($p > 0,005$) a los del grupo eCG y grupo control desde el día 35 hasta el día 60 de gestación. Luego del aborto los niveles de Progesterona descendieron (Fig 1). La yegua Ñequiza ingreso nuevamente al grupo de yeguas en servicio del haras y a los 30 días quedo preñada con semen de burro pariendo una mula normal.

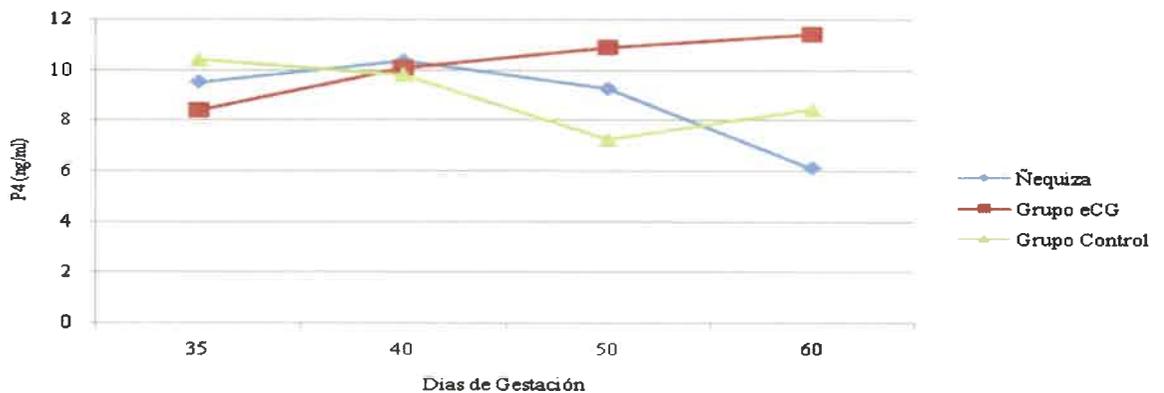


Figura 1. Concentración sérica de progesterona (ng/ml) de Ñequiza (aborto a los 60 días de gestación) y de los grupos eCG y control desde los 35 hasta los 60 días de gestación.

Tabla 1: Resumen de resultados a los 35 días de gestación

Yeguas	Variable	n	Media	D.E.	Mín	Máx	Mediana
Control	P4 ng/ml	5	10,39	3,45	5,01	14,12	10,99
eCG	P4 ng/ml	5	8,39	3,54	5,53	13,23	6,08
Control	Estrona ng/ml	4	3,61	2,25	1,37	6,71	3,18
eCG	Estrona ng/ml	5	2,25	1	1,03	3,61	2,34
Control	Nro CL	5	1	0	1	1	1
eCG	Nro CL	5	1	0	1	1	1

Tabla 2: Resumen de resultados a los 40 días de gestación

Yeguas	Variable	n	Media	D.E.	Mín	Máx	Mediana
Control	P4 ng/ml	5	9,78	5,11	2,32	16,55	10,35
eCG	P4 ng/ml	5	10,08	4,02	7,09	16,99	8,24
Control	Estrona ng/ml	4	2,04	0,56	1,44	2,78	1,97
eCG	Estrona ng/ml	5	1,63	0,32	1,12	1,91	1,63
Control	Nro CL	5	1	0	1	1	1
eCG	Nro CL	5	1	0	1	1	1

Tabla 3: Resumen de resultados a los 50 días gestación

Yeguas	Variable	n	Media	D.E.	Mín	Máx	Mediana
Control	P4 ng/ml	5	7,21	3,44	1,71	10,82	7,17
eCG	P4 ng/ml	5	10,86	2,98	7,32	14,86	11,19
Control	Estrona ng/ml	4	1,98	0,54	1,18	2,38	2,18
eCG	Estrona ng/ml	5	1,946	0,84	0,96	3,27	1,75
Control	Nro CL	5	1,5	0,58	1	2	1,5
eCG	Nro CL	5	2,4	0,55	2	3	2

Tabla 4: Resumen de resultados a los 60 días gestación

Yeguas	Variable	n	Media	D.E.	Mín	Máx	Mediana
Control	P4 (ng/ml)	5	8,40	3,09	4,58	12,41	9,46
eCG	P4 (ng/ml)	5	11,41	6,78	5,4	21,79	8,7
Control	Estrona ng/ml	4	5,39	2,32	3,61	8,81	4,58
eCG	Estrona ng/ml	5	4,44	2,38	1,89	7,21	5,34
Control	Nro CL	5	1,4	0,55	1	2	1
eCG	Nro CL	5	2,4	0,55	2	3	2

Tabla 5: Resumen de resultados a los 70 días gestación

Yeguas	Variable	n	Media	D.E.	Min	Máx	Mediana
Control	P4 ng/ml	4	8,63	3,06	5,09	12,32	8,56
eCG	P4 ng/ml	5	10,75	8,51	4,38	25,21	7,93
Control	Estrona ng/ml	4	12,97	6,76	7,08	22,45	11,18
eCG	Estrona ng/ml	5	10,65	5,37	4,15	18,58	9,37
Control	Nro CL	4	1,4	0,55	1	2	1
eCG	Nro CL	5	2,4	0,55	2	3	2

Tabla 6: Resumen de resultados a los 80 días de gestación

Yeguas	Variable	n	Media	D.E.	Min	Máx	Mediana
Control	P4 ng/ml	4	6,84	2,70	4,43	10,69	6,11
eCG	P4 ng/ml	5	9,67	6,98	3,42	21,22	9,25
Control	Estrona ng/ml	4	31,51	4,49	27,47	37,33	30,61
eCG	Estrona ng/ml	5	57,43	25,53	12,6	72,18	70
Control	Nro CL	4	1,40	0,55	1	2	1
eCG	Nro CL	5	2,40	0,55	2	3	2

Progesterona

Las concentraciones séricas de progesterona fueron variables en ambos grupos desde los 35 hasta los 80 días de gestación, con rangos de 3,42 a 25,21 ng/ml para el Grupo eCG y de 2,32 a 16,55 ng/ml para el Grupo Control (Tablas 2 – 5).

Las yeguas del Grupo eCG tuvieron un incremento en las concentraciones séricas de progesterona desde el día 35 de preñez ($8,39 \pm 3,54$ ng/ml) (Tabla 1) hasta los 60 días, $11,41 \pm 6,78$ ng/ml (Tabla 4-Fig 2).

Contrariamente, en el Grupo Control las concentraciones de progesterona a los 35 días fueron de $10,39 \pm 3,45$ ng/ml; luego comenzaron a descender hasta $7,21 \pm 3,44$ ng/ml el día 50 de gestación (Tabla 1 – 3). En este grupo a los 70 días la concentración de progesterona fue de $8,63 \pm 3,06$ ng/ml (Fig. 2).

En el Grupo eCG y Grupo Control a partir de los 70 días de gestación comenzó el descenso de las concentraciones de progesterona (Fig. 2).

Desde los 50 días de gestación hasta la finalización del estudio no existieron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,065$) entre los grupos eCG y Control. En relación a las concentraciones séricas de progesterona, no hubo efectos significativos del tratamiento $p = 0,2987$, efecto del tiempo (días) $p = 0,9067$, y no fue detectado interacción

entre el tratamiento y los días $p=0,8975$. Sin embargo, se observó una tendencia a tener mayores concentraciones séricas de progesterona el grupo eCG entre los días 50 y 80.

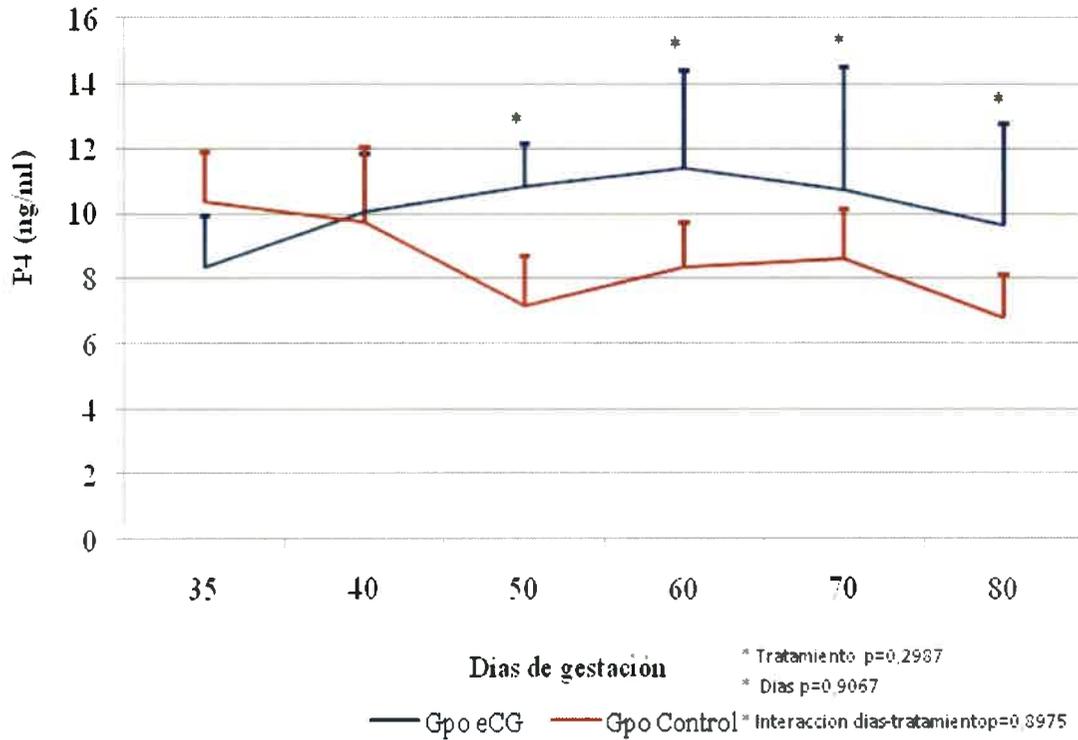


Figura 2. Concentraciones séricas de progesterona (ng/ml). Grupo eCG vs Grupo Control desde los 50 hasta los 80 días de gestación (* $p < 0,065$).

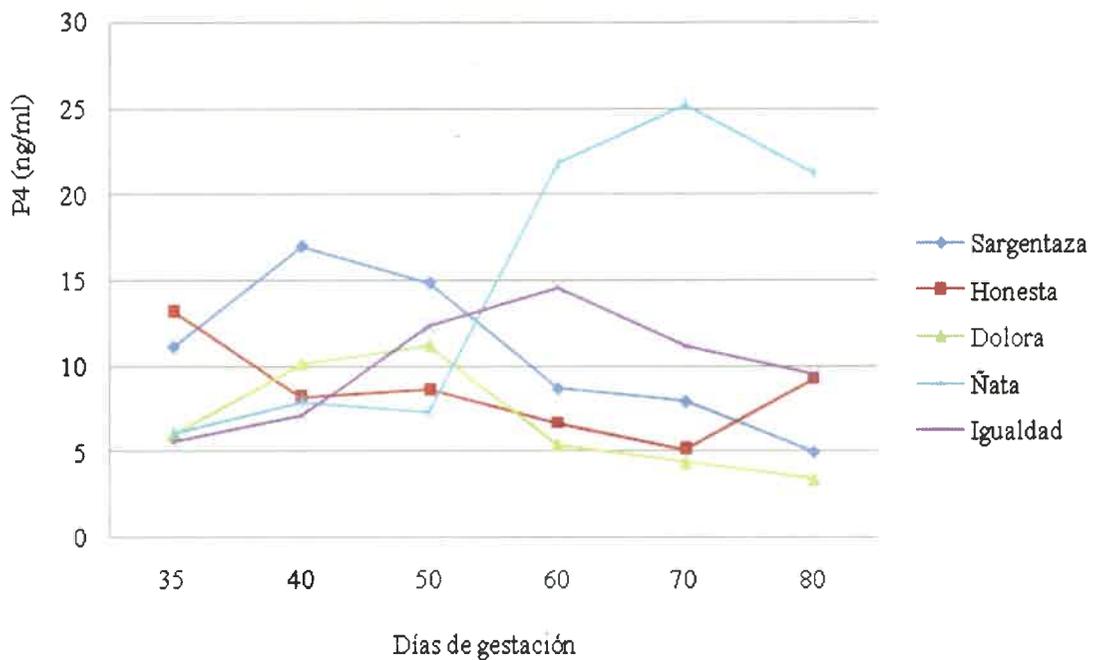


Figura 3: Concentraciones séricas individuales de Progesterona en yeguas del Grupo eCG.

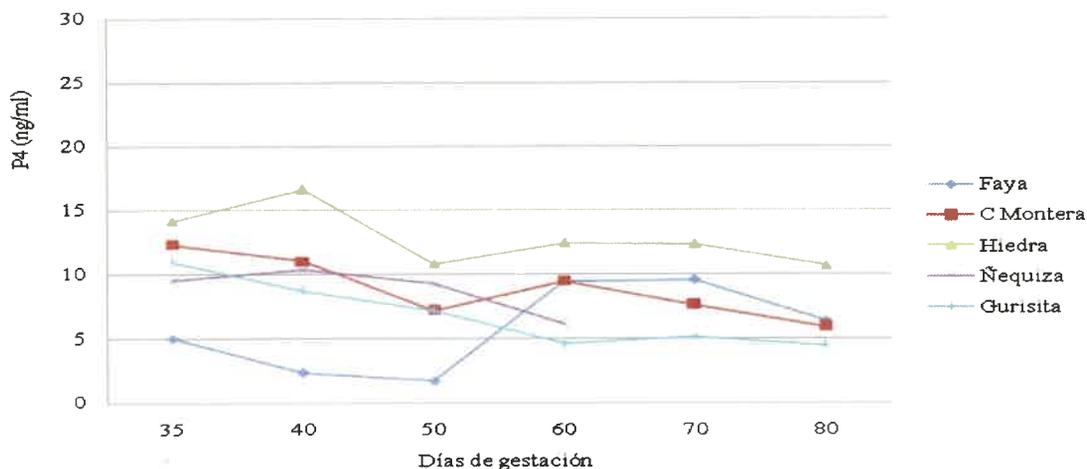


Figura 4: Concentraciones séricas individuales de Progesterona en yeguas del Grupo Control.

Cuerpos Lúteos Suplementarios

En el grupo Control solamente dos yeguas formaron cuerpos lúteos suplementarios, no así en el grupo eCG en el cual todas las yeguas al menos formaron un cuerpo lúteo suplementario (Tabla 4 – 5).

La formación de cuerpos lúteos suplementarios acumulados hasta el día 80 de gestación fue significativamente más alto ($p < 0,005$) en las yeguas del grupo eCG (N° de CL = $2,60 \pm 0,5$), que en las yeguas del grupo Control ($1,43 \pm 0,5$) (Tabla 4-5).

La formación de cuerpos lúteo secundarios en el Grupo eCG y en el grupo Control ocurrieron alrededor del día 50 de gestación y los incrementos de niveles séricos de Progesterona comenzaron en ambos grupos a partir del día 50 (Fig. 1).

Existieron diferencias significativas ($p < 0,002$) a partir del día 50 de gestación hasta el día 80 en las concentraciones séricas de progesterona en el Grupo eCG con 3 cuerpos lúteos vs Grupo Control con 2 cuerpo lúteo y 1 cuerpo lúteo (Fig. 5).

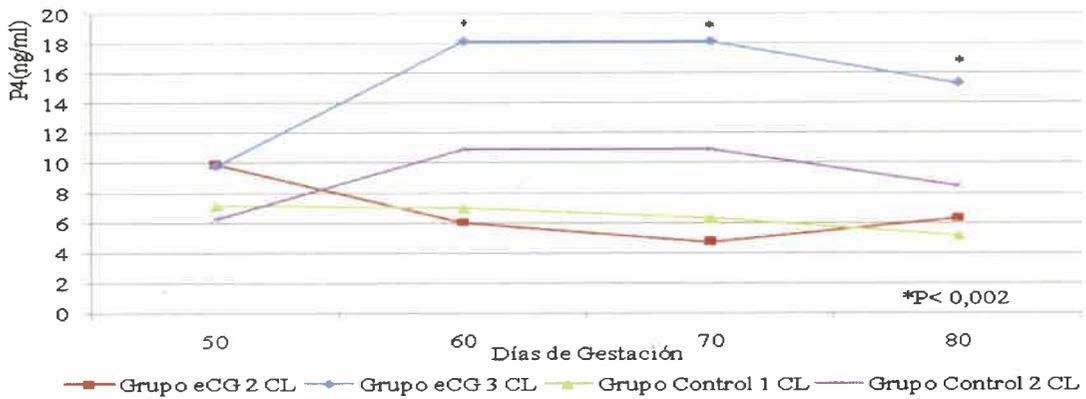


Figura 5 - Concentraciones séricas de progesterona (ng/ml) desde los días 50 hasta los 80 de gestación agrupados por número de cuerpos lúteos en Grupo eCG y Grupo Control.

La asociación lineal entre las variables concentraciones séricas de progesterona y número de cuerpos lúteos a los 60 días de gestación en el Grupo eCG fue alta ($r=0,75$)

Imagen Nro. 1 Ovario Izquierdo –Yegua Igualdad a los 60 días de Gestación (Gpo eCG) Margen derecho el Cuerpo Lúteo Primario de la Ovulación – Margen Izquierdo Cuerpo Lúteo suplementario.

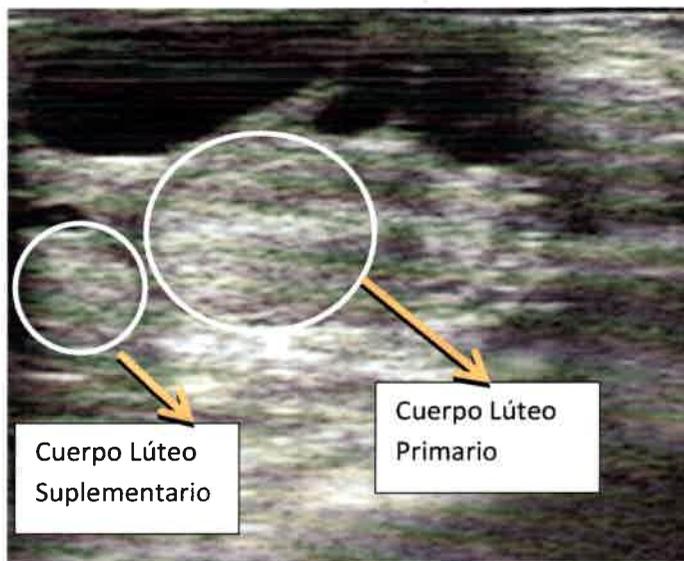


Imagen Nro. 2 Ovario Izquierdo –Yegua Ñata a los 60 días de Gestación (Gpo eCG). Centro de la imagen Cuerpo Lúteo Primario de la Ovulación – Margen Izquierdo Cuerpo Luteo suplementario. Esta yegua tuvo los niveles más altos de P4 en el Gpo eCG (Fig 3), también desarrollo otro Cuerpo Lúteo suplementario en el Ovario Derecho

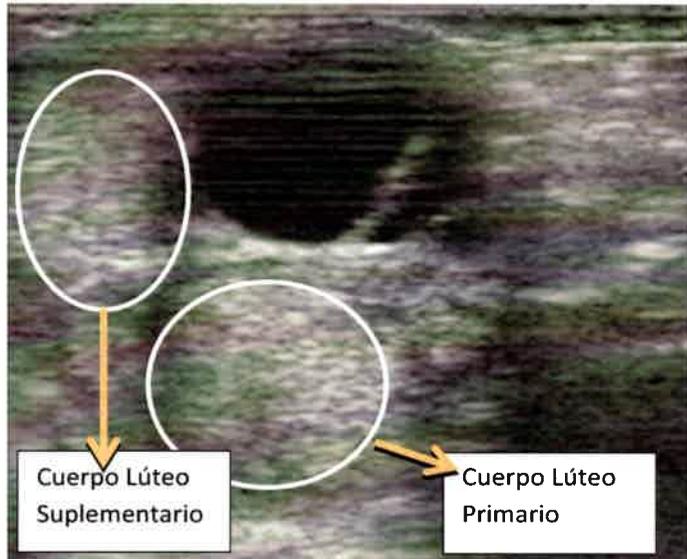
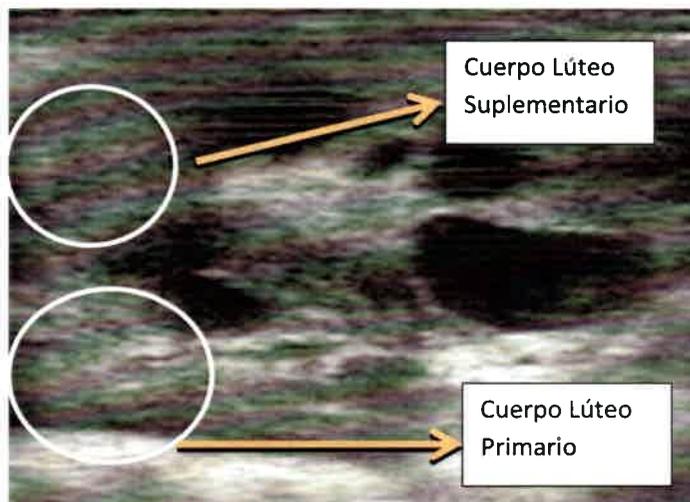


Imagen Nro. 3 Ovario Derecho –Yegua Hiedra a los 60 días de Gestación (Gpo Control) Margen izquierdo inferior el Cuerpo Lúteo Primario de la Ovulación – Margen izquierdo superior Cuerpo Lúteo suplementario. Esta yegua tuvo los niveles más altos de P4 en el Gpo Control Fig 4, no desarrollo otro Cuerpo Lúteo suplementario en el Ovario Derecho hasta la última ecografía del estudio el día 80 de gestación.



Estrógeno Conjugado- Sulfato de Estrona

El patrón de secreción de sulfato de estrona fue análogo en ambos grupos, desde el día 35 hasta el día 60 de gestación. Las concentraciones séricas de sulfato de estrona tuvieron un sostenible descenso desde el día 35 (Grupo Control: $3,61 \pm 2,25$ ng/ml y Grupo eCG: $2,04 \pm 1$ ng/ml) hasta el día 50 (Grupo Control: $1,98 \pm 0,54$ ng/ml y Grupo eCG: $1,95 \pm 0,84$ ng/ml) de gestación en ambos grupos. Las máximas concentraciones de sulfato de estrona en suero en este estudio se observaron a los 80 días de gestación (Grupo Control: $31,51 \pm 4,49$ ng/ml y Grupo eCG: $57,43 \pm 25,53$ ng/ml).

No fueron detectadas diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de sulfato de estrona entre ambos grupos desde el día 35 al día 60 gestación ($p > 0,05$) (Fig. 5).

Sin embargo, los niveles de sulfato de estrona en suero fueron diferentes durante los días 70-80 de gestación entre los grupos ($p < 0,05$) (Fig. 5).

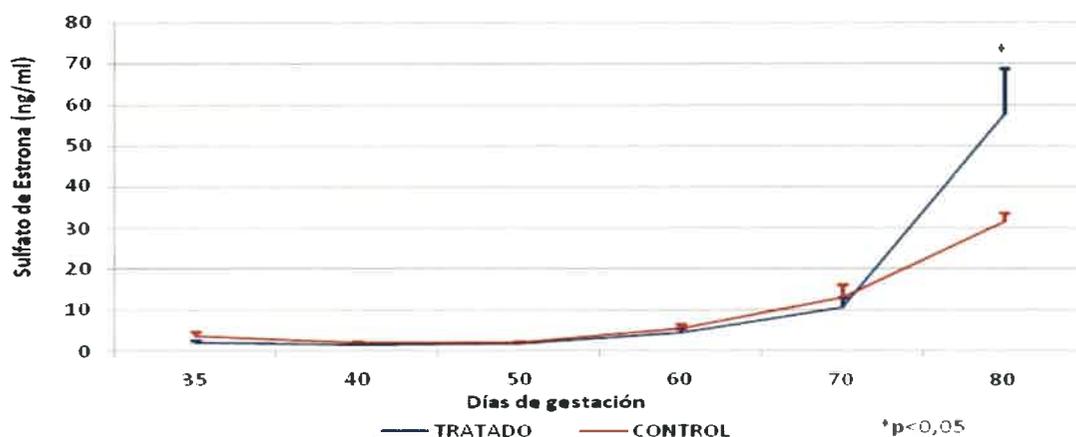


Figura 6: Concentraciones de Sulfato de Estrona (ng/ml) desde los 35 hasta los 80 días de Gestación. Grupo eCG y Grupo Control.

Muerte Embrionaria y Abortos

Tabla 7- Resumen de Perdidas Embrionaria y Abortos –Haras Gral. Las Heras –Temporada 2011-2015

Temporada	Yeguas Preñadas 15 días (n)	Perdida Embrionaria y Abortos (n)	%	Mulas Nacidas (n)
2011	116	14	13	102
2012	117	15	14	101
2013	118	22	19	96
2014	111	22	19	90
2015	112	16	15	96
2011-2015	574	89	15	485

Tabla 8 –Resumen de Perdidas Embrionarias y Abortos –Gpo eCG y Gpo Control.

	Grupo Control n= 5	Grupo eCG n=5
Muerte Embrionaria	0	0
Muerte Fetal	1	0
Total Perdida	1(20 %)	0

Discusión

La incidencia de muerte de embrionaria hasta los 40 días de gestación en los Gpo eCG y Gpo Control fueron similares a los reportados por otros autores (Boeta y Zarco, 2005; Boeta y Zarco, 2010).

La tasa de abortos en el grupo control fue menor (20% 1/5 animales) a lo previamente reportado en yeguas preñadas con semen de burro (30% Boeta y Zarco, 2005), y similar al registrado en este estudio para el Haras General Las Heras (Campo Los Andes Mendoza) durante el año 2014 (19%), año en que se realizó la sección experimental (suplementación con eCG). En contraste, no hubo ningún aborto en el grupo de yeguas suplementadas con eCG.

La formación y detección de los primeros cuerpos lúteos suplementarios se produjo entre los 50 y 60 días como ha sido reportado en estudios anteriores (Boeta y Zarco, 2010).

Los patrones de secreción y niveles de progesterona sérica en el Grupo Control fueron coincidentes con otros estudios previos para una gestación de mulas en la especie equina (Allen, 1982).

A los 60 días de gestación las yeguas del grupo eCG alcanzaron su máxima concentración por efecto de los cuerpos lúteos suplementarios $11,41 \pm 6,78$ ng/ml (Tabla 4 - Fig. 2). En contraste, las yeguas del grupo control alcanzaron su máxima concentración 10 días después, a los 70 días de gestación $8,63 \pm 3,06$ ng/ml (Fig. 2).

Las concentraciones séricas de progesterona en ambos grupos (eCG y Control) comenzó a descender a los 70 días de gestación, evento que coincide con los estudios previos de Allen en 1982, quien explica que por acción de los leucocitos maternos, los cuales reaccionan con el antígeno paterno (burro) e invaden las cúpulas endometriales destruyendo el tejido endometrial prematuramente y provocando la desaparición de la síntesis y secreción de la eCG (Allen, 1982).

En contraste con estudios previos reportados por Daels en 1998, la administración de eCG desde el día 35 de gestación no estimuló significativamente la síntesis y secreción de estrógenos conjugados durante la primera etapa del tratamiento (desde el día 35 al día 60), sin embargo en el presente trabajo se observó un efecto positivo del tratamiento con eCG sobre las concentraciones séricas de eCG en una etapa más tardía (entre los días 70 y 80 de gestación). Es necesario resaltar que Daels y col. 1998 no determinaron las concentraciones de sulfato de estrona después del día 50 y además la administración de eCG se realizó en una etapa más temprana de la gestación (entre los días 26 y 28). Estudios previos reportaron que la producción de sulfato de estrona en la yegua preñada depende de la presencia de un feto viable que produzca cantidades normales de dehidroepiandrosterona y de una placenta funcional capaz de aromatizar dichos andrógenos (Boeta y Zarco, 2010). Los resultados de este estudio permiten sugerir que la administración de eCG tendría un efecto positivo sobre la producción de sulfato de estrona en una etapa tardía de la gestación de yeguas preñadas con semen de burro. El incremento de las concentraciones séricas de sulfato de estrona a partir de los 70 días de gestación en ambos grupos también fue previamente reportado por otros autores en gestaciones de yeguas preñadas con semen de burro y de padrillo (Boeta y Zarco, 2010). Además, los resultados obtenidos en relación a las concentraciones de sulfato de estrona en los dos grupos de yeguas del estudio, son similares entre los días 35 a 70 a los reportados por Douglas en el 2004, para gestaciones de yeguas con feto equino.

En el presente estudio la administración de eCG exógena, a partir del día 35 en dosis creciente y de mantenimiento desde el día 45 hasta el día 80 de gestación, podría complementar la acción de la eCG endógena posiblemente estimulando una mayor formación de cuerpos lúteos accesorios y, de esta manera, favorecer un incremento de las concentraciones de progesterona en suero, principalmente en las yeguas tratadas que desarrollaron 3 cuerpos lúteos (Allen, 1985, Boeta y Zarco, 2012).

De forma similar a lo reportado aquí, otros autores tampoco encontraron diferencias

significativas en las concentraciones de progesterona en suero entre aquellas yeguas que desarrollaron dos cuerpos lúteos (primario y un cuerpo lúteo suplementario) en relación a las que poseen un único cuerpo lúteo (sólo el primario) (Boeta y Zarco ,2012). Asimismo, se observó que las concentraciones de progesterona fueron significativamente más elevadas en aquellas yeguas que tuvieron 3 cuerpos lúteos (un primario y dos suplementarios), lo cual también coincide con publicaciones previas (Boeta y Zarco, 2012). En el grupo control sólo dos yeguas formaron un cuerpo lúteo accesorio, esto también fue reportado en gestaciones de yeguas receptoras de embriones equinos por Cuervo- Arango et al., en 2015, quienes observaron una baja tasa de animales con cuerpo lúteos accesorios. Sin embargo, otros estudios sostienen que en la gestación de yeguas preñadas de padrillo o incluso de burro la mayoría de las yeguas debería formar al menos un cuerpo lúteo accesorio (Boeta y Zarco, 2012).

VII. CONCLUSIÓN

Los resultados de la presente Tesis permiten indicar que existe una correlación positiva entre la concentración de progesterona y el número de cuerpos lúteos suplementarios, sin embargo el desarrollo del mayor número de cuerpos lúteos suplementarios en el Gpo eCG podría ser producido por efectos de la eCG exógena, en sinergismo con la eCG endógena o por la acción de ambas. Sería necesario realizar un trabajo con un mayor número de yeguas preñadas con semen de burro para así confirmarlo. A futuro se espera determinar las concentraciones séricas de eCG en las muestras de ambos grupos y de esa manera tener una mayor certeza sobre cuál es la posible causa de las diferencias encontradas. Además, la administración de eCG en yeguas preñadas con semen de burro tendría un efecto beneficioso sobre las concentraciones de sulfato de estrona a partir del día 70 de gestación.

VIII. REFERENCIAS

- Albrecht B.A., MacLeod J.N., Daels P.F. Expression of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase, cytochrome p450 17alpha-hydroxylase/ 17,20-lyase and cytochrome p4-17alpha-oxidase enzymes in corpora lutea of diestrous and early pregnant mares. *Theriogenology* 2001; 55: 551–61.
- Allen, W.R. The immunological measurement of pregnant mare serum gonadotrophin. *J Endocrinol* 1969; 43: 593-598.
- Allen, W.R. Immunological aspects of the endometrial cup reaction and the effect of xenogenic pregnancy in horse and donkeys. *J Reprod Fertil Suppl* 1982; 31: 57–94.
- Allen W.R. Hormonal control of early pregnancy in the mare. *Anim Reprod Sci* 1984; 7: 283-304.
- Allen W.R. The physiology of later pregnancy in the mare. In: *Proceedings of the Annual Meeting of the Society for Theriogenology 2000*; pp. 3–16.
- Allen W.R. Luteal deficiency and embryo mortality in the mare. *Reprod Domest Anim.* 2001; 36:121-31.
- Bergfelt D.R., Pierson R.A., Ginther O.J. Resurgence of the primary corpus luteum during pregnancy in the mare. *Anim Reprod Sci* 1989;21:261-70.
- Betteridge, K. J. Techniques and results in cattle superovulation. In: *Embryo Transfer in Farm Animals 1977*, Agriculture Canada, Ottawa.
- Bishop C.V., Stormshak F. Non-genomic actions of progesterone and estrogens in regulating reproductive events in domestic animals. *Vet J* 2008; 176: 270–80.
- Boeta M., Zarco L. Progesterone and chorionic gonadotropin concentrations around the time of pregnancy loss in mare impregnated by donkey or stallions. *J Equine Vet Sci* 2005; 12: 537-538.
- Boeta M., Zarco L. Endocrine alterations around the time of abortion in mare impregnated with donkey or horse semen. *Anim Reprod Sci* 2010; 121: 124-130.
- Boeta M., Zarco L. Luteogenic and Luteotropic effects of eCG during pregnancy in the mare. *Anim Reprod Sci* 2012; 130: 57-62.
- Bousfield G.R., Butnev V.Y., Gotschall R.R., Baker V.L., Moore W.T. Structural features of mammalian gonadotropins. *Mol Cell Endocrinol* 1996; 125:3–19
- Cuervo-Arango J., Aguilar J.J., Vettorazzi M.L., Martinez-Bovi R. eCG concentrations, luteal structure, return to cyclicity, and post abortion fertility in embryo transfer recipient mares. *Theriogenology* 2015; 84: 1003-1013.
- Christensen B.W. Estrogens. *Equine Reproduction*, Second Edition. Edited by Angus O. McKinnon, Edward L. Squires, Wendy E. Vaala and Dickson D. Varner Blackwell Publishing Ltd 2011 ; Chapter 169:pp 1631-1636.
- Day, F. T. 1939. Ovulation and the descent of the ovum in the fallopian tube of the mare after treatment with gonadotropic hormones. *J Agric Sci* 1939; 29:459.
- Daels P.F., Demoraes J.J., Stabenfeldt G.H., Hughes J.P., Lasley B.L. The corpus luteum: source of oestrogen during early pregnancy in the mare. *J Reprod Fertil Suppl* 1991;44: 501–8.
- Daels P.F., Albrecht B.A., Mohammed H.O. Equine Chorionic Gonadotropin regulates Luteal Steroidogenesis in Pregnant Mares. *Biol Reprod* 1998; 59:1062-1068.

- Dinger, J.E. Ovarian activity in progesterone treated mare following administration of pregnant mare serum gonadotropin. *Theriogenology* 1982; 17: 305.
- Douglas, R. H. Endocrine diagnostics in the broodmare: what you need to know about progestins and estrogens. *Proc Soc Theriogenol* 2004.
- Enders A.C., Lantz K.C., Schlafke S., Liu I.K.M. New cells and old vessels: the remodeling of the endometrial vasculature during establishment of endometrial cups. *Biol Reprod Monogr* 1995; 1: 181–90
- Flores G., Velazquez E., Boeta M., Zarco L. Equine Chorionic Gonadotropin (eCG) During Pregnancy in the mare. *Reprod Dom Anim* 2014; 49: 420-426.
- Ginther O.J. *Reproductive Biology of the Mare- basic and applied aspect*. 1979; pp- 334.
- Ginther O.J. Endocrinology of pregnancy. In: *Reproductive Biology of the Mare: Basic and Applied Aspects*. Cross Plains, WI: Equiservices, 1992; pp 419-56.
- Ginther O.J, Beg M.A., Gastal E.L., Gastal M.O., Baerwald A.R., Pierson R.A. Systemic concentrations of hormones during development of follicular waves in mares and women: a comparative study. *Reproduction* 2005; 130: 379-388.
- Ho, C. K. M., Christenson, L. K., and Strauss, J. F. III. Intracellular cholesterol dynamics in steroidogenic cells. Elsevier Academic Press 2004; pp 93–110.
- Mestre A., Antczak D.F., Allen W.R. Equine Chorionic Gonadotropin (eCG) Equine Reproduction, Second Edition. Edited by Angus O. McKinnon, Edward L. Squires, Wendy E. Vaala and Dickson D. Varner Blackwell Publishing Ltd 2011; Chapter 172; pp 1648-1664.
- Murphy, B. D. Luteinization. En; *The Ovary*. Elsevier Academic Press 2004; pp. 185–199.
- Murphy, B. D. Equine chorionic gonadotropin: an enigmatic but essential tool. *Anim Reprod* 2012; pp 223-230.
- Niswender, G. D., Nett, T. M. Corpus luteum and its control in infraprimate species. In *The Physiology of Reproduction* 1994; pp. 781–816.
- Niswender, G. D., Juengel, J. L., Silva, P. J., Rollyson, M. K., and McIntush, E. W. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol. Rev* 2000; 80: 1–29.
- Ronen-Fuhrmann, T., Timberg, R., King, S. R., Hales, K. H., Hales, D. B., Stocco, D. M., and Orly, J. Spatiotemporal expression patterns of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) during follicular development in the rat ovary. *Endocrinology* 1998; 139: 303–315.
- Saint-Dizier M, Foulon-Gauze F, Lecompte F, Combarous Y, Chopineau M. Cloning and functional expression of the equine luteinizing hormone/chorionic gonadotrophin receptor. *J Endocrinol* 2004; 183:551–9.
- Satué, K., Domingo R., Redondo J.I. Relationship between progesterone, oestrone sulphate and cortisol and the components of renin angiotensin aldosterone system in Spanish purebred broodmares during pregnancy. *Theriogenology* 2011; 76: 1404-1415.
- Sherwood, O. D., and Fields, P. A. Corpus luteum peptides. In *Encyclopedia of Reproduction* 1999; pp. 718–729.
- Shore, M. D. Reproductive characteristics of pregnant mares passively immunized against equine chorionic gonadotropin. Thesis for the degree of Master of Science. 1989.

- Stocco D.M., Clark B.J. Role of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in steroidogenesis. *Biochem Pharmacol* 1996; 51: 197–205
- Stouffer R.L. and Brannian, J.D. The function and regulation of cell populations composing the corpus luteum of the ovarian cycle. In *the Ovary* (E.Y. Adashi and P.C.K. Leung, Eds) 1993; pp 245-259.
- Stouffer R.L. Structure, Function, and Regulation of the Corpus Luteum. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Elsevier 2006; Chapter 12: pp 475-526.
- Sugino H., Bousfield G.R., Moore Jr W.T., Ward D.N. Structural studies on equine glycoprotein hormones. Amino acid sequence of equine chorionic gonadotropin beta subunit. *J Biol Chem* 1987; 262: 8603–9.
- Van Niekerk C.H., Allen W.R. Early embryonic development in the horse. *J Reprod Fertil Suppl* 1975; 23: 495–8.
- Wilsher S., Allen W.R. Factors influencing equine chorionic gonadotrophin production in the mare. *Equine Vet J* 2011; 43: 430–8.